

J0835 U.S. PRO
10/014737
12/11/01

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this Office.

Date of Application: December 11, 2000
Application Number: Japanese Patent Application
No. 376258/2000
Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

October 26, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3093449

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

JPO35 U.S. PTO
10/014737
12/11/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年12月11日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-376258

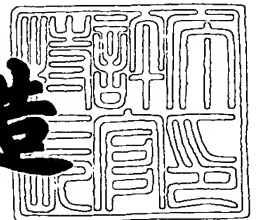
出 願 人
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3093449

【書類名】 特許願

【整理番号】 12A121

【提出日】 平成12年12月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応装置及びハイブリダイゼーション方法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 田中 俊明

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 立花 光廣

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 木島 茂

【特許出願人】

 【識別番号】 000233055

 【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応装置及びハイブリダイゼーション方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション反応装置において、
生体物質が固定化された支持体を収容する容器と、
前記容器に溶液を注入する手段と、
前記容器から溶液を排出する手段と、
前記容器内に注入した溶液を攪拌する攪拌手段とを含むことを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 2】 請求項 1 記載のハイブリダイゼーション反応装置において、
前記支持体は中央に穴を有する円形の支持体であり、前記攪拌手段は前記支持体の中央の穴に配置された攪拌子を回転駆動する手段を備えることを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 3】 請求項 1 記載のハイブリダイゼーション反応装置において、
前記攪拌手段は前記容器を一方向とその逆方向に反復して傾斜させる手段であることを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 4】 請求項 1 記載のハイブリダイゼーション反応装置において、
前記攪拌手段は前記容器に取り付けられた攪拌用羽根と前記攪拌用羽根を回転させる手段とを備えることを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載のハイブリダイゼーション反応装置において、前記容器は着脱可能であることを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載のハイブリダイゼーション反応装置において、前記容器に溶液を注入する手段は、反応溶液と洗浄溶液とを選択する溶液選択弁と、前記溶液選択弁で選択された溶液を前記容器に送る注入ポンプとを備えることを特徴とするハイブリダイゼーション反応装置。

【請求項 7】 支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイ

ブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション方法において、

生体物質が固定化された支持体を収容した容器に生体物質を含有する溶液を注入し、前記容器中の溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせることを特徴とする方法。

【請求項 8】 支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション方法において、

生体物質が固定化された支持体を収容した容器に、生体物質を含有する溶液と、前記生体物質を含有する溶液と混合せず当該溶液より比重の軽い液体とを注入し、前記生体物質を含有する溶液と前記比重の軽い液体とが層分離した状態で攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAプローブとサンプルとのハイブリダイゼーション反応、あるいはその後の洗浄を行うための装置及び方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

分子生物学や生化学の分野では、有用な遺伝子の探索や病気の診断などのために生体内の核酸や蛋白質などの生体高分子を同定・分画することが行われ、その際の前処理として、既知の配列をもつ核酸や蛋白質等の生体高分子（以下、プローブという）と試料中の蛍光標識されたターゲット分子とをハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション反応が多用されている。従来のハイブリダイゼーション反応は、表面が平坦な矩形ガラスから成る支持体上にプローブを固定し、その上からターゲットを含むハイブリダイゼーション反応溶液を滴下してカバーガラスをのせ、一定時間恒温槽に放置する方法で行っていた。また、反応後は支持体を恒温槽から取り出した後、洗浄溶液中で1時間以上静置または振とうし、支持体表面上の未反応のターゲットを洗い落としていた。プローブ及びターゲットはいずれも生体物質であり、具体的にはDNA又はRNAである。DNAとRNAとのハイブリダイゼーションの場合もある。また、支持体上にターゲットを固定

し、ハイブリダイゼーション反応溶液中の蛍光標識したプローブとハイブリダイゼーション反応させる場合もある。

【0 0 0 3】

【本発明が解決しようとする課題】

従来の方法でのハイブリダイゼーション反応は、反応に一晚（例えば15時間以上）と非常に長時間を要する。また、その後の洗浄操作は、支持体を恒温槽から取りだして行う必要があり、手間がかかり煩雑である。

本発明は、このようなハイブリダイゼーション反応の現状に鑑み、反応効率を高めて反応時間を短縮することのできるハイブリダイゼーション反応装置を提供することを目的とする。

【0 0 0 4】

また、本発明は、装置から支持体を取り出すことなくハイブリダイゼーション反応からその後の洗浄操作までを一貫して行い、操作を簡略化することのできるハイブリダイゼーション反応装置及びハイブリダイゼーション方法を提供することを目的とする。

【0 0 0 5】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明では、DNA等の生体物質が固定化された支持体を入れるケースと、このケースに反応溶液や洗浄溶液を注入、排出するためのポンプと、反応を効率化するための溶液の攪拌機構と、反応中の温度を制御する恒温槽を備える装置を用いる。また、生体物質を固定する支持体として、中心に穴を持つ円盤型支持体を用い、ハイブリダイゼーション反応あるいは反応後の洗浄の際、反応溶液や洗浄液を攪拌し、反応時間あるいは洗浄時間の短縮を図る。

【0 0 0 6】

すなわち、本発明によるハイブリダイゼーション反応装置は、支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション反応装置において、生体物質が固定化された支持体を収容する容器と、容器に溶液を注入する手段と、容器から溶液を排出する手段と、

容器内に注入した溶液を攪拌する攪拌手段とを含むことを特徴とする。

【0007】

支持体は中央に穴を有する円形の支持体とすることができ、そのとき攪拌手段は支持体の中央の穴に配置された攪拌子を回転駆動する手段とすればよい。攪拌手段は、また、容器を一方向とその逆方向に反復して傾斜させる手段（振とう機）とすることができる。あるいは、容器に取り付けられた攪拌用羽根と攪拌用羽根を回転させる手段とによって攪拌手段を構成してもよい。

【0008】

容器は装置本体から着脱可能とする。

また、容器に溶液を注入する手段は、反応溶液と洗浄溶液とを選択する溶液選択弁と、溶液選択弁で選択された溶液を容器に送る注入ポンプとを備えることができる。

【0009】

本発明によるハイブリダイゼーション方法は、支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション方法において、生体物質が固定化された支持体を収容した容器に生体物質を含有する溶液を注入し、容器中の溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせることを特徴とする。

【0010】

また、本発明によるハイブリダイゼーション方法は、支持体に固定化された生体物質と溶液中の生体物質とのハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション方法において、生体物質が固定化された支持体を収容した容器に、生体物質を含有する溶液と、生体物質を含有する溶液と混合せず当該溶液より比重の軽い液体とを注入し、生体物質を含有する溶液と前記比重の軽い液体とが層分離した状態で攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせることを特徴とする。この方法によると容器内に注入する反応溶液の量を抑えることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を実施する場合の一形態を図面を参照して具体的に説明する。ここでは支持体上に固定したDNAプローブと、標識したDNAターゲットとをハイブリダイゼーション反応させる場合を例にとって説明するが、プローブとターゲットの組み合わせはこれに限られない。また、以下では具体的数値を挙げて説明する場合があるが、これは発明の理解を容易にするための単なる一例として述べるものであり、本発明がそれらの具体的数値によって限定されることを意味するものではない。

【0012】

図1は、本発明によるハイブリダイゼーション反応装置の一例を示す断面模式図である。このハイブリダイゼーション反応装置は、プローブが固定化された支持体を収納するケース3、反応中、支持体及び反応溶液を一定温度に維持するための恒温槽4、ケース3中に置かれた攪拌子2を回転させるためのスターラ5、ケース3内に溶液を注入するための溶液注入部、ケース3内の溶液を排出するための溶液排出部、装置の各部をハイブリダイゼーション反応及びその後の洗浄の各段階に応じて制御するための制御部（制御用PC）50を備える。ケース3及びスターラ5は、熱源およびその制御部からなる温度コントローラ16によって一定温度に維持される恒温槽4中に配置されている。

【0013】

溶液注入部は、反応溶液だめ7及び洗浄溶液だめ8を選択する溶液選択弁20、溶液選択弁20によって選択された容器中の溶液をケース内に注入するための注入用ポンプ6、及び容器7、8と溶液選択弁20の間、溶液選択弁20と注入用ポンプ6の間、注入用ポンプ6とケース3の溶液注入口との間を接続する配管を備える。溶液排出部は、ケース3の溶液注入口から溶液を排出するための排出用ポンプ22及び排液だめ9を備える。また、制御部50は、予めプログラムされた手順に従って溶液選択弁20、注入用ポンプ6、排出用ポンプ22、後述する注入弁ユニット15及び排出弁ユニット21、温度コントローラ16、スターラ5を制御する。反応溶液は、有機溶媒としてのSSCと、界面活性剤としてのSDSと、サンプルである標識したDNAターゲットと、水とで構成されている。

【 0 0 1 4 】

図 2 はケース及び支持体の構造の一例を示す概略図であり、図 2 (a) は斜視図、図 2 (b) は断面図である。

支持体 1 は、一例として中心に直径 2 5 m m の穴を有する直径 5 0 m m 、厚さ 1 m m のガラスプレートからなる円盤型支持体であり、上面に多数種類のプローブ DNA が同心円状あるいは螺旋状のトラックに沿って固定化されている。

【 0 0 1 5 】

ケース 3 は厚さ約 1 m m のポリカーボネート製で、直径 7 0 m m 、高さ 2 0 m m の円形容器である。ケース 3 は上部に開閉可能な蓋を有し、蓋を取り外して円盤型支持体 1 や攪拌子 2 を出し入れすることができる。蓋 2 6 は、図 3 に示すように、縁に密閉用ゴム 2 7 を装着してケースを密閉できる構造になっている。円形ケース 3 には、その直径方向の一端に溶液注入口 1 0 が、他端に溶液排出口 1 1 が設けられている。溶液注入口 1 0 はケースの上方の位置に設けられ、溶液排出口 1 1 は容器内の溶液を完全に排出できるようにケースの下方位置に設けられている。ケース内を確実に密閉するため、この例では溶液注入口 1 0 をケースの上端から 5 m m 下がった位置に設けた。また、溶液注入口 1 0 には注入弁ユニット 1 5 が、溶液排出口 1 1 には排出弁ユニット 2 1 が取り付けられる。

【 0 0 1 6 】

ケース 3 は恒温槽 2 内から着脱自在で、図 4 に示すように、溶液注入口 1 0 と注入弁ユニット 1 5 の間、および溶液排出口 1 1 と排出弁ユニット 2 1 の間で取り外すことが出来る。

注入弁ユニット 1 5 及び排出弁ユニット 2 1 が、それぞれ開いている様子、閉じている様子を図 5 及び図 6 に示す。図 5 は注入弁ユニット 1 5 を示し、図 6 は排出弁ユニット 2 1 を示す。注入弁ユニット 5 及び排出弁ユニット 2 1 は、一例として、開閉を弁制御ユニット 3 0 から制御可能な電磁弁 3 1 、電磁弁が開いている時に、溶液の逆流を防ぐための逆流防止弁 3 2 から構成することができる。逆流防止弁 3 2 は、溶液の移動する方向にのみ可動で、逆流方向へは動くことができない。

【 0 0 1 7 】

ケース3内に溶液を注入する様子を図7に示す。この時、注入弁ユニット15は開いている状態であり、排出弁ユニット21は閉じている状態である。一方、ケース3内の溶液を排出する様子を図8に示す。この時、注入弁ユニット15は閉じている状態であり、排出弁ユニット21は開いている状態である。注入弁ユニット15および排出弁ユニット21は、弁制御ユニット30を介して、制御部（制御用PC）50から制御される。

【0018】

本例の場合、ケース3内を充填するのに必要な溶液の量は約7.7mlになる。従来のハイブリダイゼーション反応溶液の量は約20 μ lであるため、従来と比べて必要な反応溶液の量は約400倍になるが、その分溶液の濃度を薄くして必要なサンプル量を従来と同じにした。また、円盤型支持体1を収容したケース3内の溶液を攪拌子2によって攪拌して反応効率を高める。攪拌子2は、一例として長さ20mmとした。

【0019】

この方法によると、サンプルは従来に比較して400倍に希釈されるが、その分、溶液の容量も増えるので溶液の攪拌が可能になり、攪拌することで溶液の希釈前より反応効率を上げることが可能になる。すなわち、反応溶液を適度に攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせることにより、攪拌による反応機会増大の効果がサンプルの希釈による反応機会減少の効果より大きくなるようにすることができる。また、サンプル容積が増えることで、チューブやポンプを含む送液系の採用が可能となり、実験操作を自動化することが可能となる。

【0020】

図9は、このハイブリダイゼーション反応装置を用いたハイブリダイゼーション反応及び洗浄操作の処理手順の概要を示すフローチャートである。

まず、DNAプローブが固定された支持体1をケース3に挿入し、ケース3を装置にセットする。具体的には、ケース3の蓋26をとり、ケース3内に生体物質が固定化された支持体1を挿入する。支持体1はケース3の中央部分に置くが、厳密に中央である必要はない。攪拌子2を使う場合は、支持体3の中央開口部に攪拌子2を置く。その後、ケースの蓋をして、ケース3を装置にセットする。

この時、図4に示すように、ケース3の溶液注入口10および溶液排出口11を注入弁ユニット15および排出弁ユニット21から延びる装置内のチューブ28に挿入し、チューブ28とケース3を接続する。

【0021】

こうして準備作業が終わったら制御部50に反応開始を指示する。制御部50は、ステップ11において、反応溶液をケース内3に充填する操作を行う（ステップ11）。すなわち、制御部50は、溶液選択弁20によって反応溶液を選択し、反応溶液だめ7からDNAサンプルを含む反応溶液を注入用ポンプ6を用いてケース3内に注入する。このとき、図7に示すように、ケース3の注入弁ユニット15は開位置とされ、排出弁ユニット21は閉位置とされる。ケース3内に反応溶液が充填したら注入弁ユニット15を閉じ、ケースを密閉状態にする。

【0022】

次に、制御部50は、ステップ12において、恒温槽の温度コントローラ16をONにし、ケース3全体を加熱して反応温度を一定に保つ。反応温度はサンプルとなるターゲットDNAにもよるが、通常は50℃から65℃の間に設定されることが多い。そして、ステップ13に進んで、制御部50はケース3内の反応溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行わせる。具体的にはスターラー5の電源スイッチをONにして攪拌子2を回転させることで、ケース3内に充填した反応溶液12を攪拌する。

【0023】

図10は、ケース3内でのハイブリダイゼーション反応の様子を示す図である。支持体1上に固定されたプローブDNA14は、反応溶液12中のターゲットDNA29と塩基配列が相補的な場合のみ、ターゲットDNA29と反応し結合する。この時、反応溶液12の攪拌によって反応溶液中のターゲットDNA29と円盤型支持体1上のプローブDNA14との反応機会が増え、反応効率が高くなる。これにより、ハイブリダイゼーション反応に要する時間の短縮が可能となる。ただし、攪拌子2の回転速度が速すぎると、反応効率が逆に低下したり、ケース内の反応溶液が均一に攪拌できなくなって支持体1上で反応効率にむらが発生する恐れがあるので、ここでは回転子2の回転速度を1 r p sとした。本発明

によって、従来 1 5 時間以上かかっていた反応時間を、約 5 時間に短縮することができた。

【 0 0 2 4 】

反応が終了すると、ステップ 1 4 に進んで、制御部 5 0 は恒温槽の温度コントローラ 1 6 を OFF にする。その後、ステップ 1 5 において、制御部 5 0 は排出用ポンプ 2 2 を用いて反応溶液 1 2 をケース 3 から廃液だめ 9 に排出する。この時、図 8 に示すように、ケース 3 内の注入弁ユニット 1 5 は閉位置に制御し、排出弁ユニット 2 1 は開位置に制御する。注入弁ユニット 1 5 と排出弁ユニット 2 1 を操作することで、確実にケース 3 内の溶液を排出することが可能である。

【 0 0 2 5 】

反応溶液の排出が終了すると、ステップ 1 6 に進み、制御部 5 0 は溶液選択弁 2 0 によって洗浄溶液だめ 8 側を選択し、注入用ポンプ 6 により洗浄溶液をケース 3 内に注入し、ケース 3 内に充填する。この時、図 7 に示すように、注入弁ユニット 1 5 は開位置に制御し、排出弁ユニット 2 1 は閉位置に制御する。ただし、洗浄溶液の注入開始時に短時間、排出弁ユニット 2 1 も開位置に制御し、洗浄液を流通させるようにしてもよい。洗浄溶液がケース 3 内に充填したら注入弁ユニット 2 1 を閉じ、ステップ 1 7 に進んで、制御部 5 0 はハイブリダイゼーション反応の時と同様にスターラー 5 に駆動信号を与え、洗浄溶液を攪拌して支持体を洗浄する。

【 0 0 2 6 】

図 1 1 は、ケース 3 内での支持体 1 の洗浄の様子を示す図である。反応溶液の排出によって反応溶液中のターゲット DNA も排出されるが、プローブ DNA 1 4 とのハイブリダイゼーションによらずに支持体 1 上に付着して残ったターゲット DNA を、その後の洗浄操作によって洗い流している。反応溶液の注入と同様に、洗浄溶液 1 3 をケース内に注入して支持体 1 上の洗浄を行う。洗浄操作は確実に行う必要があるので、何回か繰り返して行う。攪拌子 2 を用いた洗浄溶液 1 3 の攪拌によって短時間での洗浄が可能になる。

【 0 0 2 7 】

洗浄が終わるとステップ 1 8 に進み、制御部 5 0 は、図 8 に示すように、ケー

ス 3 内の注入弁ユニット 1 5 を閉位置に、排出弁ユニット 2 1 を開位置に制御して洗浄溶液 1 3 を排出する。ここでは、洗浄溶液 1 3 に 0. 2 × S S C / 0. 1 % S D S 溶液を用い、確実に支持体表面を洗浄するために、回転子（攪拌子）2 の回転速度を 2 r p s として 1 0 分間の洗浄操作を繰返し 3 回行った。

【 0 0 2 8 】

その後、ハイブリダイゼーション反応の終了した支持体をケースから取り出し、図示しない検出装置にセットして反応結果の検出を行う。以上の方法によるハイブリダイゼーション反応は、従来法と比べて、反応時間および洗浄時間を短縮できる、反応から洗浄までを自動化することができる、といった利点がある。

【 0 0 2 9 】

図 1 2 は、本発明によるハイブリダイゼーション反応装置の他の例を示す断面模式図である。図 1 2 において、図 1 と同じ部分には図 1 と同じ符号を付し、詳細な説明を省略する。

図 1 に示した反応装置は攪拌子で反応溶液を攪拌して反応効率を高めることによって反応時間の短縮を図ったが、図 1 2 に示す反応装置はケース 3 を振とうすることによって反応溶液を攪拌し、それによって反応効率を高めて反応時間の短縮を図るものである。ここで、振とうとは、シーソー運動と同じように、中心を支点に上下に振ることをいう。図 1 2 に示したハイブリダイゼーション反応装置は、スターラー 5 に代えて振とう機を備えた点で図 1 に示したハイブリダイゼーション反応装置と異なっている。

【 0 0 3 0 】

振とう機 1 7 は、ケース 3 を載せる台 1 7 a と、振とう機本体 1 7 b とからなる。振とう機本体 1 7 b は、台 1 7 a を中心で支えながら、台 1 7 a の両端を交互に上下させる構造を有し、ケース 3 全体をシーソー運動と同じ動きで振とうし、ケース 3 内の反応溶液 1 2 を攪拌するものである。振とうによる攪拌の場合、振とうの速度が速すぎると反応効率が逆に低下する恐れがあるので、ケース 3 の最も高速に動く位置でみて 1 c m の距離を 2 秒で傾く速さで振とうを行った。振とう機 1 7 b の O N / O F F 、振とうの周期、振幅は制御部 5 0 から制御することができる。装置内に設置されるケース 3 は、図 4 に示すように、ケース 3 の振と

う動作を妨げない十分な長さを有するチューブ 28 によって装置の配管系と接続される。

【0031】

このハイブリダイゼーション反応装置を用いたハイブリダイゼーション反応及び洗浄操作の処理手順は、図 9 にて説明した処理手順とほぼ同じである。ただし、ステップ 13 における反応溶液の攪拌及びステップ 17 における洗浄溶液の攪拌の際にスターラー 5 の代わりに振とう機 17 を作動させる。

【0032】

図 13 は、本発明によるハイブリダイゼーション反応装置の更に他の例を示す断面模式図である。図 13 において、図 1 と同じ部分には図 1 と同じ符号を付し、詳細な説明を省略する。

図 13 に示すハイブリダイゼーション反応装置はケース 3 の蓋 26 に攪拌用羽根 23 を備え、羽根 23 の回転によって反応溶液を攪拌し、それによって反応効率を高めて反応時間の短縮を図るものである。回転モーターの電源、制御用の I/O ケーブルは一つにまとめられ、I/O ケーブルは制御部 50 につながっている。

【0033】

図 14 は支持体を収容したケースの斜視図、図 15 は羽根が付設された蓋の詳細図である。攪拌用羽根 23 は、一例として長さを 20 mm、高さを 3 mm とした。攪拌用羽根 23 は、回転軸 25 に固定されてケースの蓋 26 に回転自在に設けられている。ケース 3 を装置内に設置するとき、ケース 3 の蓋 26 から突出している回転軸 25 を、装置内に設置された回転モータ 19 と接続する。回転モータ 19 によって回転軸 25 が回転されると、回転軸 25 に固定された攪拌用羽根 23 が回転されて反応溶液 12 が攪拌される。回転モータ 19 は制御部 50 によって制御される。攪拌用羽根 23 の回転速度が速すぎると、反応溶液が長時間安定して攪拌されず、また反応効率が逆に低下する恐れがあるので、ここでは回転速度を 1 rps とした。

【0034】

このハイブリダイゼーション反応装置を用いたハイブリダイゼーション反応及

び洗浄操作の処理手順は、図 9 にて説明した処理手順とほぼ同じである。ただし、反応溶液の攪拌及び洗浄溶液の攪拌の際にスターラー 5 の代わりに回転モータを作動させる。

【 0 0 3 5 】

以上のように、本発明によると、反応溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーション反応を行うことによって反応時間を短縮することが可能である。しかし、反応溶液を攪拌するには支持体 1 を収容した容器（ケース）3 中に反応溶液を注入する必要があり、プローブを固定した支持体上にサンプルを滴下しカバーガラスを載せた状態で反応させる従来法に比較して多くのサンプルを必要とする。従って、サンプル量を従来法と同じにした場合には、希釈率の高いサンプルを使用せざるを得ない。

【 0 0 3 6 】

図 1 6 を用いて、このサンプル量あるいはサンプル希釈率に関する問題点を軽減するための方法について説明する。図 1 6 は、図 1 0 に相当するハイブリダイゼーション反応時のケース断面図である。

図 1 6 に示したケースの構造は図 1 0 と同じであるが、ケース内に注入されている溶液が図 1 0 の場合と異なる。図 1 0 の場合、ケース内全体に反応溶液を充填したが、図 1 6 においては、ケース 3 内の下方にプローブが固定化されている支持体 1 が浸漬される程度に反応溶液 1 2 を注入し、その上に反応溶液より比重が軽く反応溶液と混合することのない液体 2 4 を注入する。反応溶液の上に入れる液体 2 4 としては、例えば流動パラフィン（比重 0. 8 3 ~ 0. 8 6）またはミネラルオイル（比重 0. 8 4 ~ 0. 8 8）を用いることができる。このように、反応溶液 1 2 の上に反応溶液 1 2 と混合しない液体 2 4 を注入してケース 3 内を充填することで、必要な反応溶液量あるいはサンプルの希釈率を抑えながら、反応溶液 1 2 を攪拌することができる。

【 0 0 3 7 】

この場合の装置構成例としては、例えば図 1 に示した装置の溶液注入部に反応溶液より比重が軽く反応溶液と混合することのない液体 2 4 が入った容器を追加し、溶液選択弁 2 0 を 3 種類の溶液を選択できるものに変更すればよい。そして

、制御部 5 0 は、図 9 に示した処理手順のステップ 1 1 において、最初に反応溶液 1 2 をケース内に所定量注入した後、その反応溶液 1 2 の上部に反応溶液より比重が軽く反応溶液と混合することのない液体 2 4 を注入するようにすればよい。

【 0 0 3 8 】

なお、プローブを固定化した支持体の形状として中央に穴のあいた円盤型支持体の例によって本発明を説明してきたが、攪拌子を用いるハイブリダイゼーション反応装置と共に用いる場合以外は支持体に中央の穴は必ずしも必要ではない。また、振とうによる攪拌の場合は、支持体の形状は円盤型に限らず矩形の支持体であってもよい。矩形の支持体を用いる場合には、支持体を収容するケースも矩形とするのが好ましい。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

本発明によると、ハイブリダイゼーション反応及び洗浄操作を短時間で効率的に行うことができる。また、反応から洗浄までを一実験系で行うことができ実験操作の簡略化が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明によるハイブリダイゼーション反応装置の一例を説明する図。

【図 2】

攪拌子による攪拌の場合のケースの構造を示す図。

【図 3】

ケースの蓋の構造を示す図。

【図 4】

ケースを恒温槽から着脱する様子を示す図。

【図 5】

注入弁ユニットの開閉の様子を示す図。

【図 6】

排出弁ユニットの開閉の様子を示す図。

【図 7】

ケース内に反応溶液及び洗浄溶液を注入する様子を示す図。

【図 8】

ケース内の反応溶液及び洗浄溶液を排出する様子を示す図。

【図 9】

本装置を用いたハイブリダイゼーション反応及び洗浄操作の処理手順の概要を示すフローチャート。

【図 1 0】

ケース内でのハイブリダイゼーション反応の様子を示す図。

【図 1 1】

ケース内での洗浄の様子を示す図。

【図 1 2】

本発明の、ケースの振とうによる攪拌の場合の装置を説明する図。

【図 1 3】

本発明の、攪拌用羽根の回転による攪拌の場合の装置を説明する図。

【図 1 4】

攪拌用羽根の回転による攪拌の場合のケースの構造を示す図。

【図 1 5】

蓋付きケースの構造を示す図。

【図 1 6】

反応時に上澄み溶液を用いた時のケース内の様子を示す図。

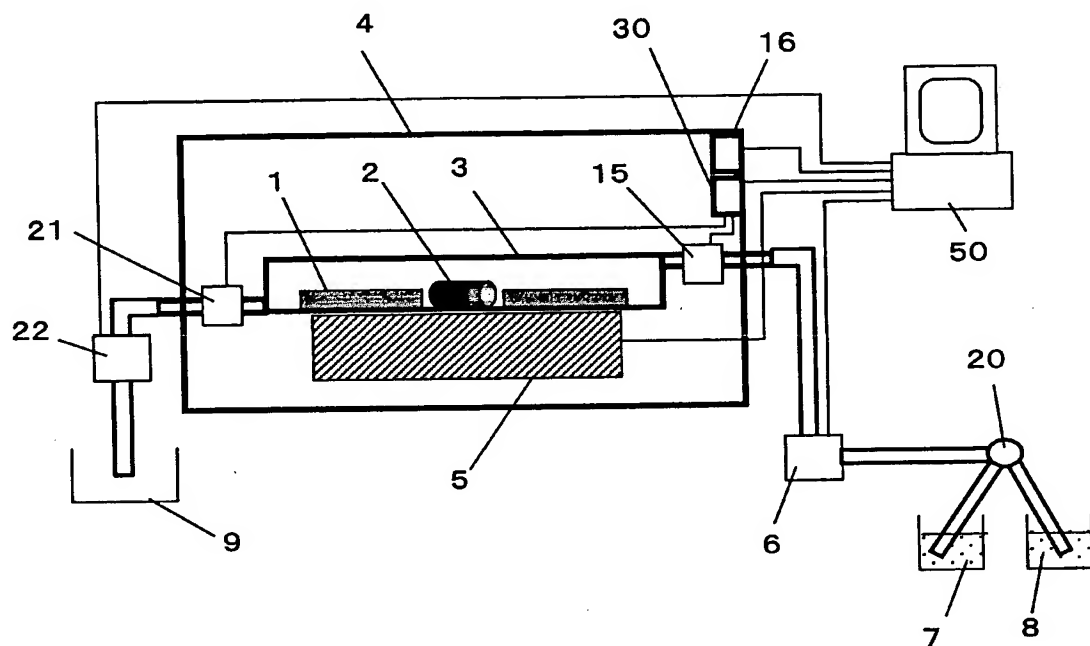
【符号の説明】

1 … 円盤型支持体、2 … 攪拌子、3 … ケース、4 … 恒温槽、5 … スターラー、
6 … 注入用ポンプ、7 … 反応溶液だめ、8 … 洗浄溶液だめ、9 … 廃液だめ、10
… 注入口、11 … 排出口、12 … 反応溶液、13 … 洗浄溶液、14 … プローブ D
NA、15 … 注入弁ユニット、16 … 温度コントローラ、17 … 振とう機、18
… 蓋付きケース、19 … 回転モータ、20 … 溶液選択弁、21 … 排出弁ユニット
、22 … 排出用ポンプ、23 … 攪拌用羽根、24 … 上澄み溶液、25 … 軸、26
… 蓋、27 … 密閉用ゴム、28 … チューブ、29 … ターゲット DNA、30 … 弁

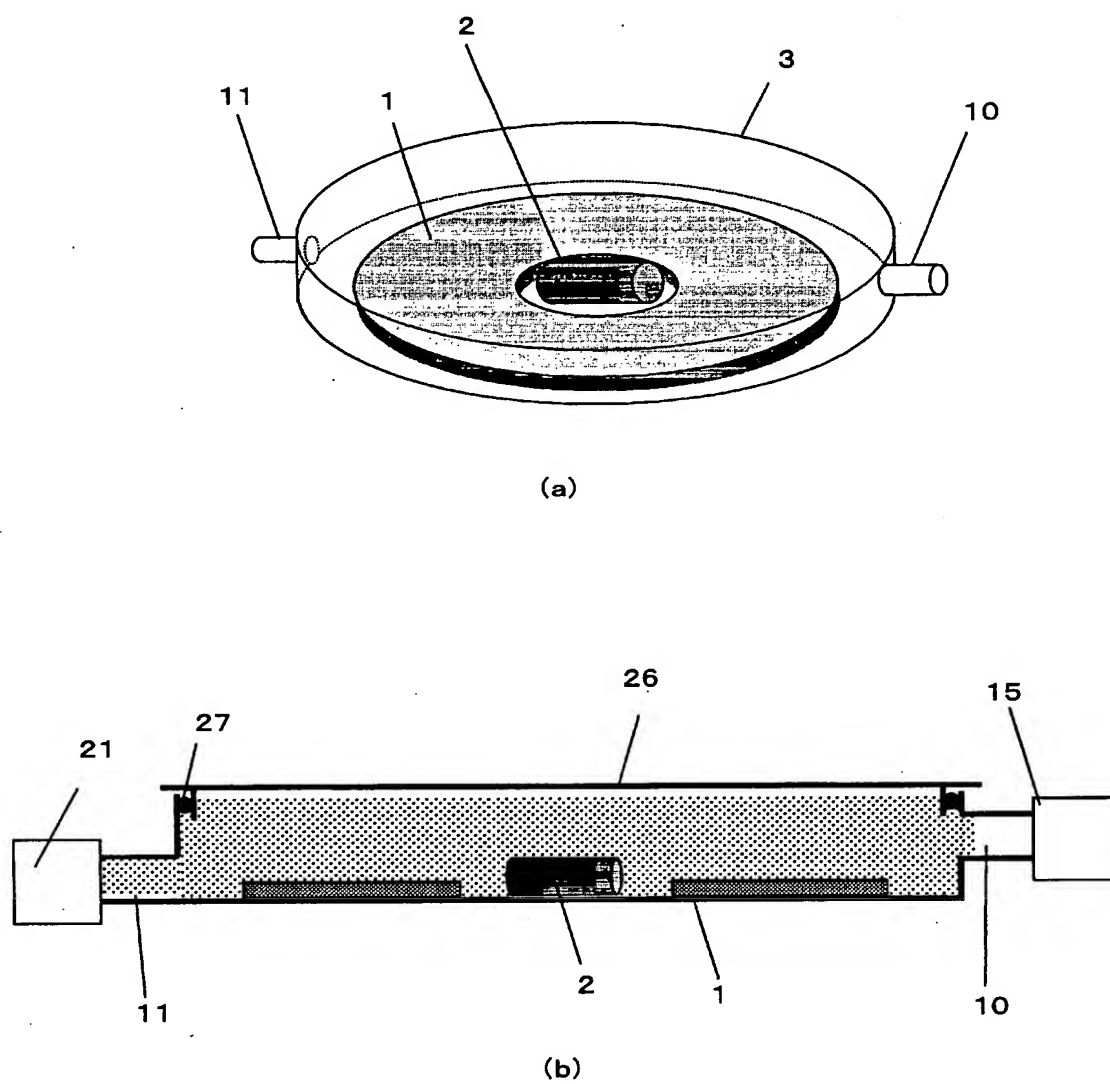
制御ユニット、31…電磁弁、32…逆流防止弁、50制御部

【書類名】 図面

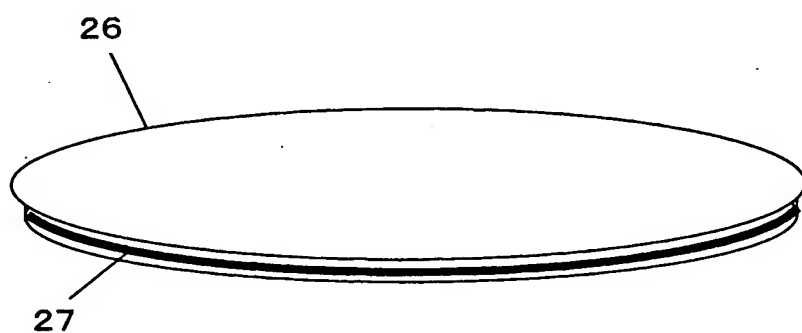
【図 1】



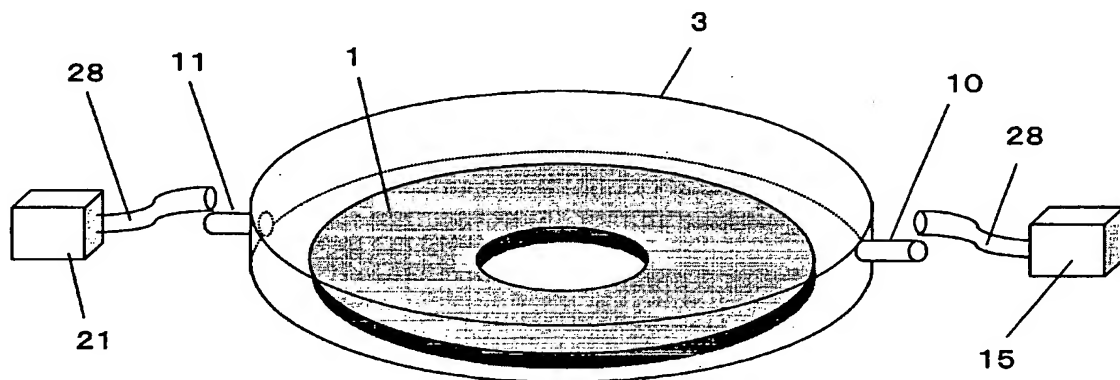
【図2】



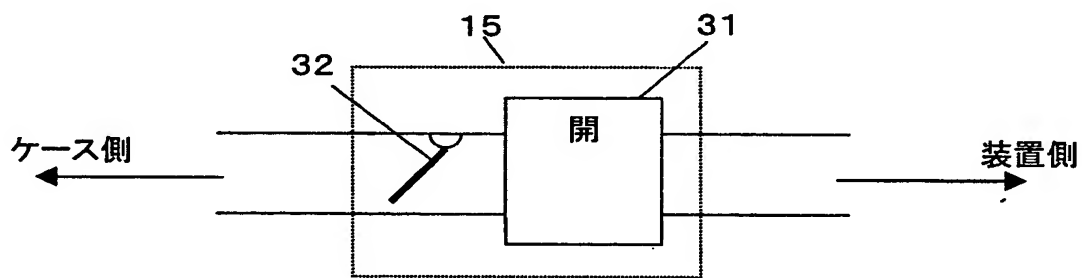
【図3】



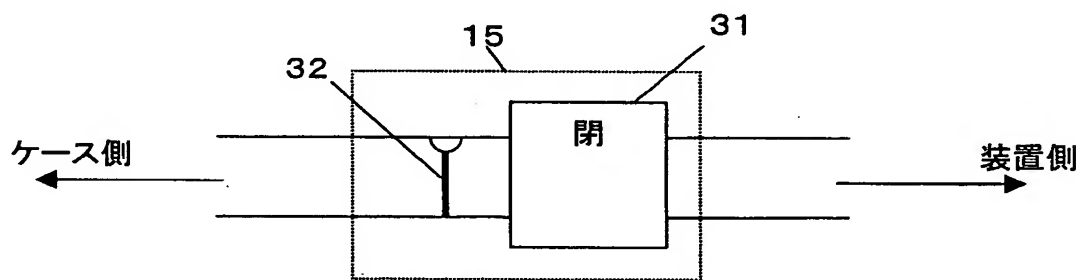
【図 4】



【図 5】

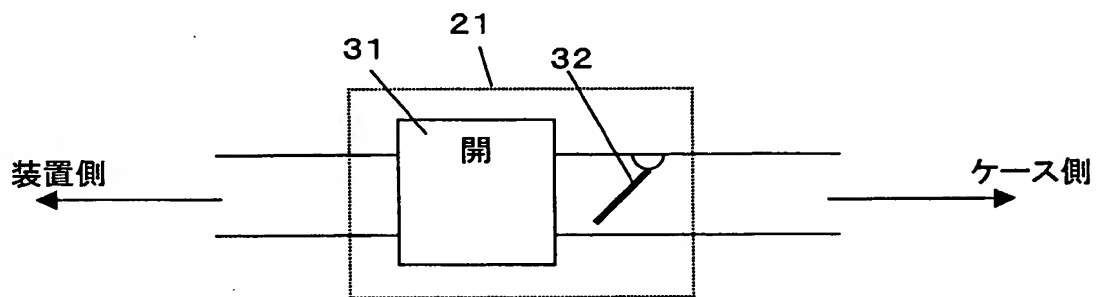


(a)

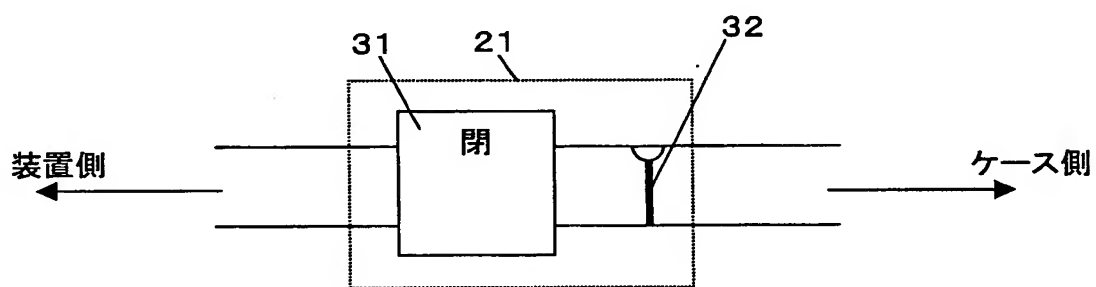


(b)

【図 6】

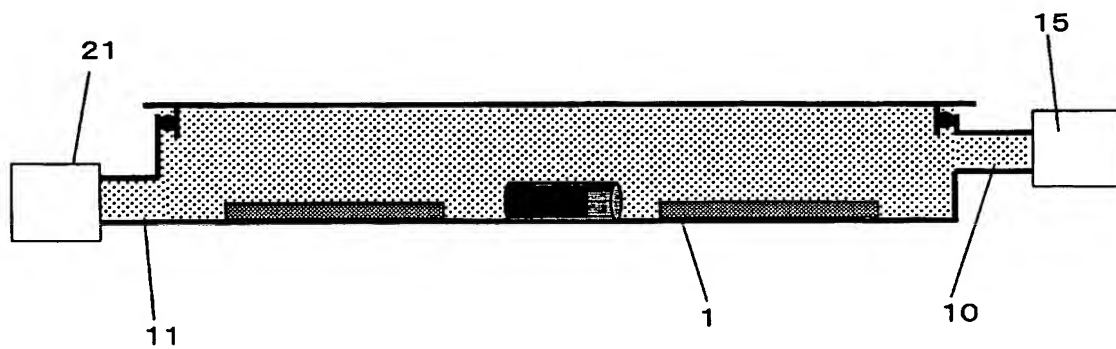


(a)

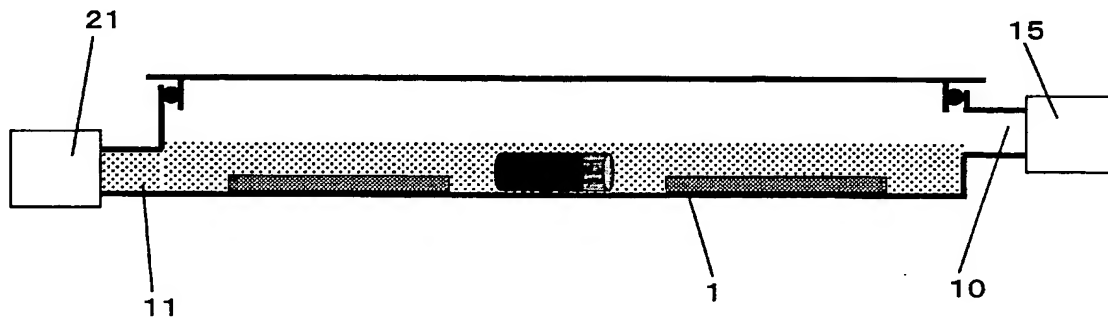


(b)

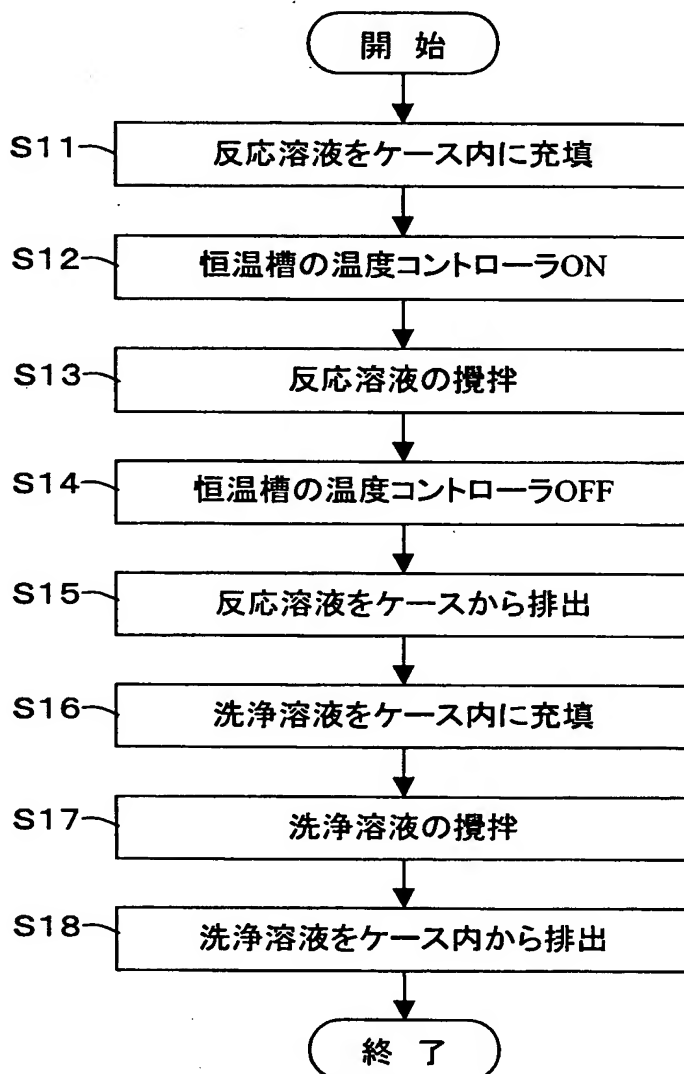
【図 7】



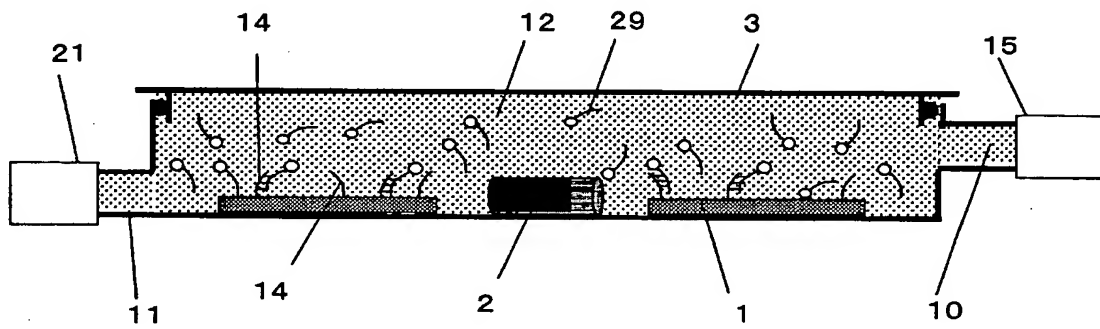
【図 8】



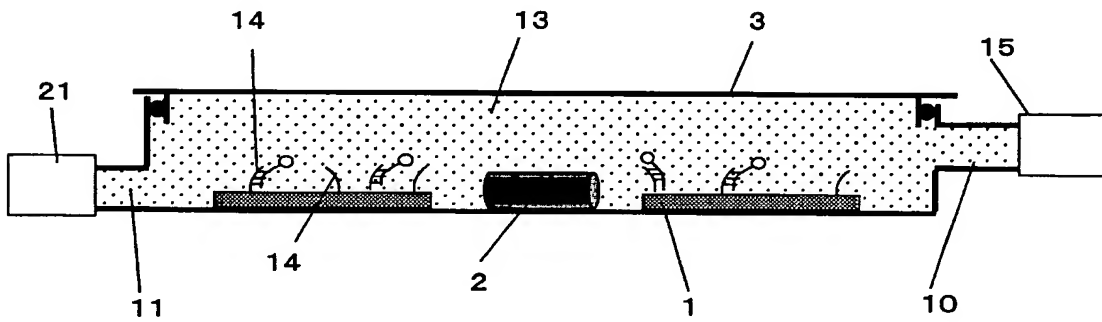
【図 9】



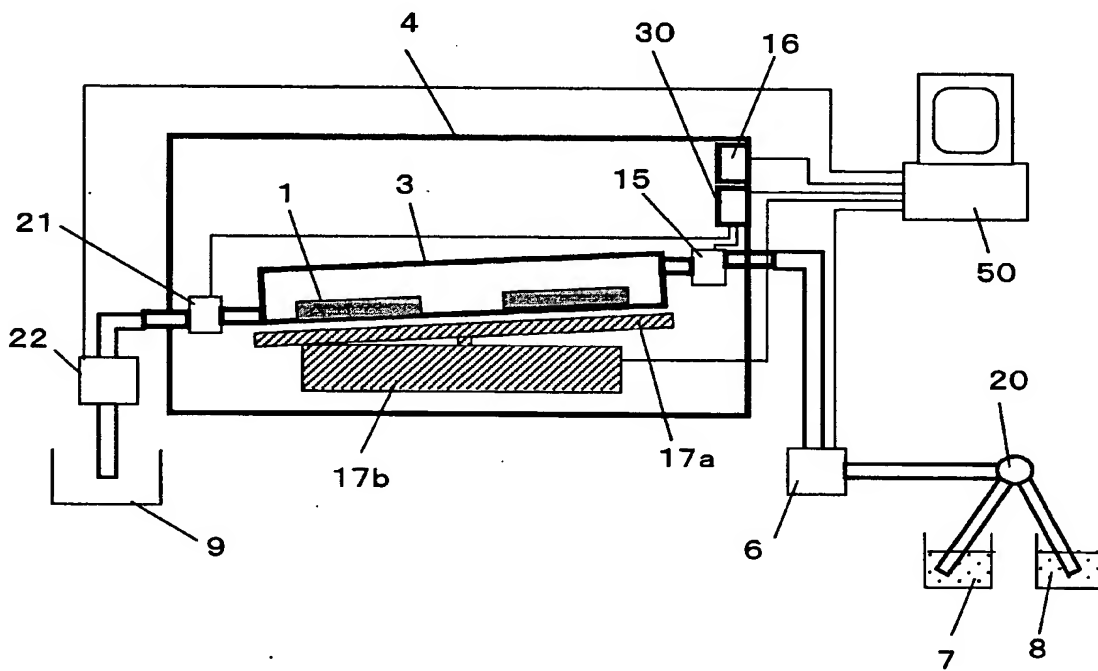
【図10】



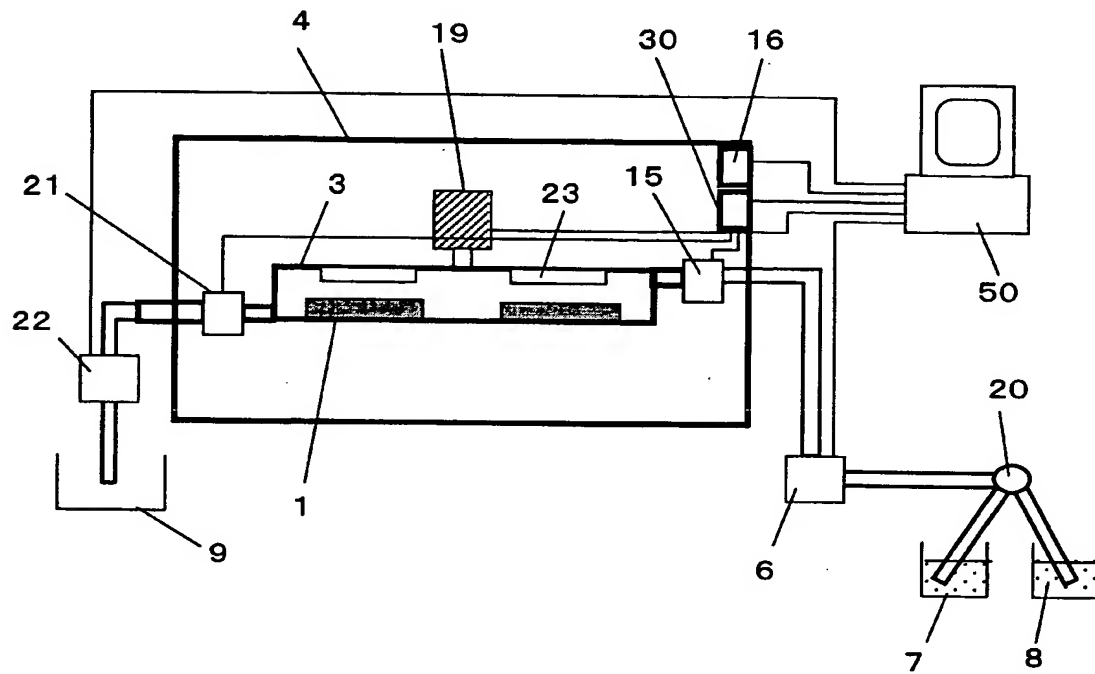
【図11】



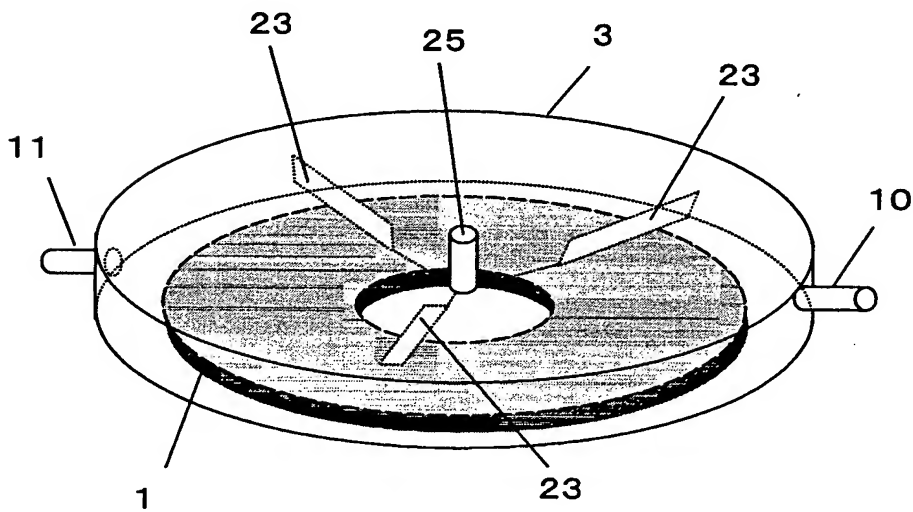
【図12】



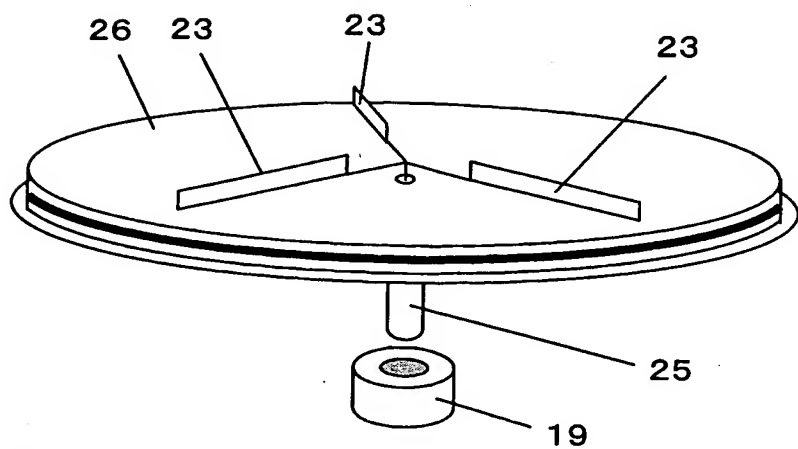
【図 13】



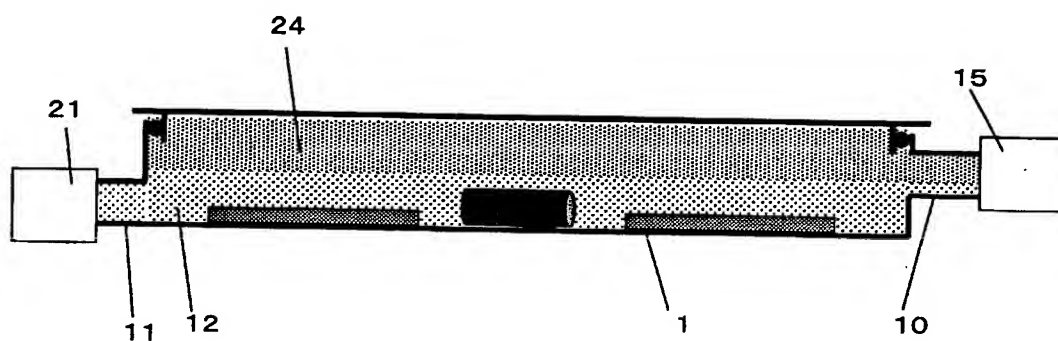
【図 14】



【図15】



【図16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 装置から支持体を取り出すことなくハイブリダイゼーション反応からその後の洗浄操作までを一貫して行い、操作を簡略化する。

【解決手段】 生体物質が固定化された支持体 1 が入ったケース 3 に、ポンプ 6 によって反応溶液や洗浄溶液を注入し、またポンプ 2 2 によって排出する。支持体 1 として中心に穴を持つ円盤型支持体を用いて穴の位置に攪拌子 2 を配置し、ハイブリダイゼーション反応あるいは反応後の洗浄の際、反応溶液や洗浄液を攪拌して反応時間あるいは洗浄時間の短縮を図る。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社